

LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 염증반응에서 흰민들레의 항염증 효과

김민준^{1,2#}, 배기상³, 최선복^{1,2}, 조일주^{1,2}, 김동구^{1,2},
신준연^{1,2}, 이성곤^{1,2}, 김명진^{1,2}, 박성주^{1,2,3}, 송호준^{1,2*}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 한의학전문대학원 BK21 플러스팀,
3 : 원광대학교 한방체액조절연구센터

The anti-inflammatory effect of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells

Min-Jun Kim^{1,2#}, Gi-Sang Bae³, Sun Bok Choi^{1,2}, Il-Joo Jo^{1,2}, Dong-Goo Kim^{1,2},
Joon-Yeon Shin^{1,2}, Sung-Kon Lee^{1,2}, Myoung-Jin Kim^{1,2}, Sung-Joo Park^{1,2,3}, Ho-Joon Song^{1,2*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
2 : BK21 plus team, Professional graduate school of Oriental medicine, Wonkwang University
3 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : *Taraxacum coreanum* (TC) have been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases and anti-oxidant effect in Korea. However, the anti-inflammatory effect of TC water extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation is not well-known. Therefore, this study was performed to identify the anti-inflammatory effect of TC on LPS induced inflammatory.

Methods : RAW 264.7 cells were treated with 500 ng/mL of LPS. Water extracts of TC (0.1, 0.25, 0.5 mg/ml) was treated 1 h prior to LPS. Cell viability was measured by MTT assay. Levels of nitric oxide (NO) were measured with Griess reagent and pro-inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). We also examined molecular mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-B (NF-κB) activation by western blot.

Results : Water Extract from TC itself did not have any cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. TC treatment inhibited the production of NO production, and pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and IL-1β on protein and mRNA levels. In addition, TC treatment inhibited the LPS-induced activation of MAPKs such as extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and NF-κB.

Conclusions : In summary, our result suggest that treatment of TC could reduce the LPS-induced inflammation. Thereby, TC could be used as a protective agent against inflammation. Also, this study could give a clinical basis that TC could be a drug or agent to prevent inflammation.

Key words : *Taraxacum coreanum* (TC), lipopolysaccharide (LPS), RAW264.7 cells, inflammation, macrophages

서론

염증은 생체조직에서의 주요 방어반응으로 작용하고, 다양한 병리 생화학적인 반응에서 중요한 인자 역할을 한다. 염증이

진행되는 동안 neutrophils, macrophage 같은 inflammatory cell들이 과도하게 반응을 일으키게 되면 이때 분비되는 inflammatory cytokines 들이 염증반응을 유도하고, 이는

*Corresponding author : Ho-Joon Song, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6844 · E-mail : songhj@wonkwang.ac.kr

#First author : Min-Jun Kim, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6837 · E-mail : alswns988@gmail.com

· Received : 15 October 2014 · Revised : 7 November 2014 · Accepted : 11 November 2014

류마티스 관절염, 죽상 동맥경화증, 폐혈증과 같은 질환을 일으키게 할 수 있다^{1,2)}.

Lipopolysaccharide (LPS) 는 대식세포의 감염초기에 반응하고 숙주 방어에 주요 역할을 하는 그람 음성균의 외막 성분이다^{3,4)}. 그러나 LPS의 과도한 자극은 macrophage에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시키며, nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2)등의 염증매개물질을 분비 시킨다^{3,4)}. NO는 대식세포가 활성화되면 inducible NO synthase (iNOS)로부터 생산되며 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할도 하지만, 과도한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. Cytokine의 분비는 신호전달경로에서 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절되어 인산화가 활성화가 일어나게 된다. NF- κ B는 활성화 되면 결합해 있던 inhibitory kappa B α (I κ B α)가 분해되면서 세포질에서 핵 내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진시키는 전사인자로서 작용한다^{6,7)}.

흰민들레 *Taraxacum coreanum* (TC)는 국화과(Compositae)의 여러해살이 풀인 민들레의 종류로 꽃이 노란색인 민들레 (*Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt)와 비슷하지만 이와 달리 흰색인 것이 특징이다⁸⁾. 민들레는 포공영(蒲公英)으로 味는 苦, 甘하고 性은 寒하며, 肝, 胃經에 작용하고 清熱解毒, 消癰散結, 利濕通淋의 효능이 있다고 알려져 있고, 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 사용 되었다. 서양의 학에서는 항산화, 항균, 담즙 분비 촉진, 항류마티스 및 이뇨 등에 사용할 수 있는 약재로 여러 질병에 오래전부터 널리 사용되었다⁹⁻¹⁴⁾. 특히 흰민들레는 최근 연구에서 위암의 억제, 항산화 효과, 항균활성 등의 효능이 밝혀졌다¹⁵⁻¹⁷⁾. 흰민들레의 대표적인 생리 활성 성분들에는 n-hexane, trichloromethane, ethyl acetate, n-butanol 등이 있다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 하지만 LPS감염 시, 염증 조절 효능은 밝혀지지 않았다.

이에 우리나라에서 흰색꽃인 민들레에 대한 연구가 부족하여 재배한 흰색 꽃인 민들레를 채취하여 연구에 착수하게 되었다. 본 연구는 흰민들레 물 추출물의 RAW 264.7 대식 세포에서 항염증작용 및 기전을 밝히고자 LPS로 염증을 유도하여 염증 매개물질인 NO, 전 염증성 cytokine의 발현을 조사하였고, 이에 따른 기전을 조사하기 위해 MAPKs과 NF- κ B의 활성화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

흰민들레는 서울시 도봉구 도봉동에서 재배한 것으로 흰민들레 1kg을 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선한 후 사용하였다. 흰민들레는 원광대학교 한의과대학 송호준교수에 의하여 동정 및 확인되었다. 흰민들레 추출물을 얻기 위하여 물 1ℓ 에 흰민들레 100 g을 넣고 2시간 30분

동안 전탕한 액을 여과한 후 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말 가루는 6.7 g으로 수율은 6.7 %였다.

2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Chloroform, TRIzol, Sodium dodesyl sulfate (SDS), Acrylamide, Tris-HCL, LPS 등은 SIGMA(St.Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK는 Cell Signaling (MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-I κ B α 는 Santa Cruz (CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% Fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2. 방법

1) MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁 하였고, 여러 가지 농도로 TC를 처리하였다. 24시간동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, viability(%) = 100 × (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)]

2) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁 하였고, 여러 가지 농도로 TC를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 자

극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

3) Cytokine (IL-1 β , IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 세포에 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 알아보기 위하여, LPS를 자극하기 전 TC 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. 전염증 cytokine의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-1 β , IL-6를 구입하여 시행하였다.

4) RNA 추출

Total RNA는 Easy Blue (intron biotechnology USA)시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 TC를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 제거하고 바닥에 남은 세포를 Easy Blue 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

5) 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응 (Quantitative RT-PCR)

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR master mix 4 μ l (Roche), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 그 후에 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 forward(f)와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Roche (Basel, Switzerland)에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

IL-1 β : 5' -TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3' (forward)
5' -GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3' (reverse)
universal probe, M15131.1V (probe)

IL-6: 5' -TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3' (forward)
5' -GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3'(reverse)
universal probe, M20572.1V (probe)

6) Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 60 mm culture dish에 5 \times 10⁶ cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 TC (0.5 mg/ml)를 전처리 하고 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 0, 15, 30, 60 분 뒤에 cold

PBS로 3회 세척한 후 cell을 획득하여 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라 앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 NF- κ B를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

7) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램의 one way ANOVA에 준하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 흰민들레 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

TC 추출물이 세포의 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 RAW 264.7 세포에 TC 물 추출물을 처리하여 MTT 방법을 통하여 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 TC는 0.1-1 mg/ml농도에서 100%의 생존율을 보이며, 세포 독성에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다. 이에 0.1-1 mg/ml를 이 연구의 유효 농도로 설정하였다(Fig. 1).

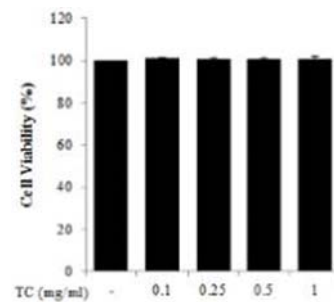


Fig. 1. Effect TC extract on cytotoxicity in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were incubated with TC extract as indicated concentration. After 24h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. The similar results were obtained from three additional experiments.

2. LPS로 유도한 흰민들레 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

TC 물 추출물이 염증에서의 NO의 생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 Griess 반응을 통한 세포 상층액의 NO 생성을 측정된 결과 TC 전 처리군에서 LPS로 유도한 NO 생성을 억제하였다(Fig. 2). 하지만 1 mg/ml의 농도에서는 자체적인 NO증가 및, 0.5 mg/ml대비 억제능력 감소를 보아, 1 mg/ml의 농도는 세포 생존에는 무리를 주지 않았지

만(Fig. 2), 자체적인 NO생성을 유도하여 세포에게 유해할 수 있으므로, 후후 실험에서 배제하였다.

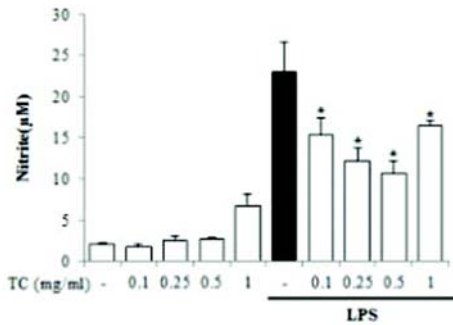


Fig. 2. Effect of TC extracts on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 0.1, 0.25, 0.5 and 1 (mg/ml) of TC extract and LPS (500ng/ml) for 24 h. The amount of NO in supernatant was measured using Griess reagent. $P < 0.05$: significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. LPS로 유도한 흰민들레 추출물이 IL-1β 및 IL-6 생성에 미치는 영향

LPS로 유도로 인한 전 염증성 cytokine의 생성에 관하여 TC 물 추출물의 효과를 확인하기 위하여 ELISA assay를 이용해 cytokine을 측정하였다. TC 물 추출물을 1시간 전 처리한 후 RAW 264.7 cell을 24시간 동안 LPS로 자극 하였다. 그 후 cytokine의 발현을 측정한 결과, TC 처리군에서 IL-1β 및 IL-6 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 관찰 하였다 (Fig. 3).

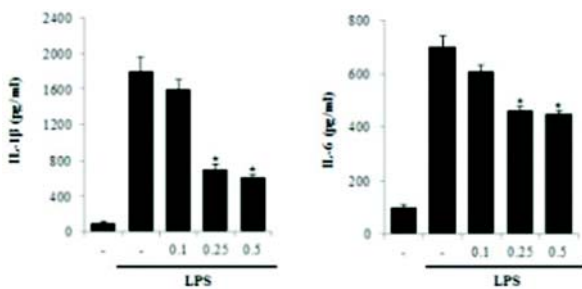


Fig. 3. Effect of TC extract on the production of IL-1β and IL-6 in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with TC extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. $P < 0.05$: significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. 흰민들레 추출물이 IL-1β 및 IL-6 mRNA 수준에서 미치는 영향

TC 물 추출물이 RAW 264.7 cell에서 전 염증성 cytokine들을 단백질 수준에서 억제하였음을 착안하여 mRNA 수준에서도 전 염증성 cytokine의 활성을 억제 할 수 있는지 확인 하기 위하여 TC 물 추출물을 1시간 전 처리 한 후 RAW 264.7 cell을 24시간 동안 LPS로 자극 하여 IL-1β 및 IL-6

의 mRNA를 정량적 증합 효소 반응 방법으로 측정을 하였다. 그 결과 TC 물 추출물을 전 처리한 군에서 IL-1β 및 IL-6의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4).

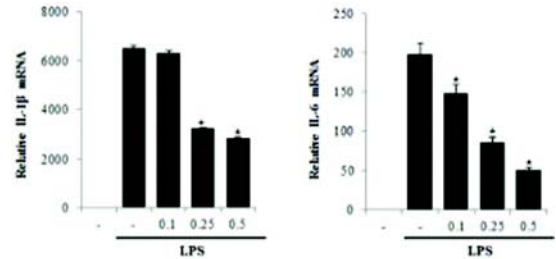


Fig. 4. Effect of TC extract on the mRNA expression of IL-1β and IL-6 in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with TC extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. IL-1β and IL-6 mRNA levels were measured by real time RT-PCR. $P < 0.05$: significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

5. 흰민들레 추출물이 MAPKs 및 NF-κB의 활성화에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포들은 다양한 신호전달물질에 의해 cytokine들을 분비하게 되는데, 대표적인 경로로 MAPKs와 NF-κB가 있다. TC 물 추출물 0.5 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 시간대별로 자극하였다. 이를 분석한 결과 TC 물 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p38, JNK ERK1/2 모두 인산화를 억제하는 결과를 보였다. 또한 NF-κB의 활성화 지표인 Iκ-Bα의 분해 결과, TC 물 추출물이 LPS에 의한 Iκ-Bα의 분해를 억제할 수 있었다 (Fig. 5).

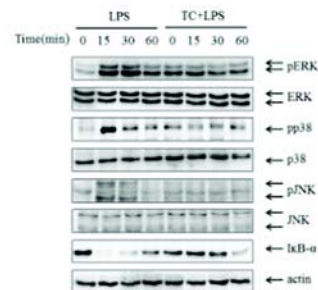


Fig. 5. Effect of TC extract on MAPKs activation and Iκ-Bα degradation in RAW 264.7 cells. The cell were pre-treated with TC (0.5 mg/ml) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative western blots of at least four separate experiments are shown.

고찰

우리나라에서 자생하는 민들레는 흰민들레, 좀민들레(한라민들레), 산민들레, 서양민들레, 민들레의 종류가 있는데 이 가운데 흰민들레종만 흰색꽃이 피며 대부분 노란꽃이 핀다⁸⁾. 이로서 흰민들레보다 서양민들레(*Taraxacum officinale*)와 민들레(*Taraxacum platycarpum*)에 대한 연구가 많이 진행

된 반면 우리나라 특산종인 흰민들레에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 이로서 흰민들레에 대한 약재 개발과 함께 효능에 대한 연구를 하게 되었다. 포공영은 味는 苦, 甘하고 性은 寒하며, 肝, 胃經에 작용하고 淸熱解毒, 利水通淋의 효능이 있어 癰腫瘡瘍, 乳癰, 肺癰, 目赤疼痛, 濕熱黃疸, 熱淋澀痛 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다. 현대에 이르러 여러 연구에서 포공영은 동맥경화 유발원인인 저밀도지질단백질의 산화 억제, 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨, 면역 관련 활성, 위장보호 효과 등의 효과가 보고 되어있고, 흰민들레는 항암, 항산화, 항균에 관한 효과가 알려져 있다. 이러한 선행연구를 살펴본바 민들레의 한 종류인 염증성 면역 반응에서도 유효하게 작용 할 수 있을 것이라 판단하여 이번 실험에서의 약물로 선택 되었다. 최근에는 흰민들레의 메탄올 추출물에 관한 항염증 실험이 보고되었지만¹⁸⁾, 흰민들레의 물 추출물에 관해서는 알려진 바가 없어 이에 본 연구에서는 흰민들레의 물 추출물에 RAW 264.7 cell을 LPS로 유도한 염증 모델에서 염증매개물질들의 생성증가에 미치는 영향을 조사하고, 그의 다른 기전을 밝혀냄으로써 흰민들레의 항염증 효과를 살펴보고자 하였다.

염증이 일어나게 되면 NO같은 염증매개인자들이 생성된다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine을 통해 NO를 생산 하게되며¹⁹⁾, 이는 산화적 스트레스에 기여한다. iNOS는 LPS자극에 의해 발현되는데 이는 과량의 NO를 생성하게 되어 세포에 산화 스트레스를 주어 세포의 중양 및 손상에 기여하여 염증을 일으키게 된다^{20,21)}. 이런 염증매개인자들은 다양한 염증질환들에 병리학적 영향을 미치는데, 흰민들레의 이러한 결과는 흰민들레가 NO의 발현을 억제함으로써 염증을 억제하는 것을 설명한다. 또한 흰민들레의 메탄올 추출물의 결과에서도¹⁸⁾ NO 생성을 억제하는 것으로 나타났고, 물추출물의 결과에서보다 더 많은 억제효과를 보였다. 이는 메탄올 추출물에서 다양한 항염효과를 나타내는 성분이 많이 추출되는 것으로 생각된다. 하지만, 흰민들레는 일반적으로 열수로 추출하여 복용하기 때문에 다른 용매 추출물보다 물 추출물이 더 의미 있다고 생각된다.

염증의 중요한 지표인 전염증성 사이토카인으로 알려진 IL-6, IL-1 β 는 다양한 염증매개체들의 유도과 면역반응의 조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 전염증성 인자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와주며, 특히 이들 중에서 IL-1 β 와 IL-6는 염증성 질환 등에서도 주요한 작용을 하며, 실제로 패혈증과 같은 염증성 질환이 일어났을 때, 장기로 유입되어서 장기 손상과 부전을 일으킨다고 보고되어있다²²⁾. 흰민들레의 물 추출물을 전처리 한 후 LPS 자극을 준 군에서 IL-6, IL-1 β 의 생성을 단백질 단계와 mRNA 수준에서 유의성있게 억제하는 효과를 보였다. 이는 흰민들레가 사이토카인 억제를 통하여 염증을 조절할 수 있음을 보여준다.

MAPKs는 LPS와 같은 자극으로 염증반응이 발현 되면 활성화되는 세포내 신호전달에 관여하는 인자이다. MAPKs의 활성화가 일어나게 되면, 핵 안으로 이동하여 활성인자를 인산화하고 cytokine 생성에 관여한다²³⁾. 현재까지 알려진 MAPKs는 p38, ERK 1/2, JNK가 있다^{24,25)}. NF- κ B는 면역이나 염증반응 같은 다양한 유전자 발현 등에 관여하는 전사 인자이다. NF- κ B는 정상적인 세포질에서는 inhibitory kappaB

(I κ -B)단백질과 결합 되어있는데, LPS에 의해 NF- κ B가 자극을 받게 되면, I κ -B가 인산화 되어, NF- κ B와 분리되고, NF- κ B는 핵 내로 이동하여 COX-2, iNOS, cytokine등 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도하게 된다²⁴⁾. 이러한 결과로 NF- κ B는 I κ -B의 분해를 통하여 알 수 있다. I κ -B는 LPS 자극을 통한 염증반응에서 분해된다. 그러므로 I κ -B의 분해를 억제하면 NF- κ B의 활성화도 억제된다고 할 수 있다. 흰민들레의 물 추출물은 MAPK family인 p38, JNK, ERK1/2의 신호전달 억제와 I κ -B 분해를 억제하여 대식세포에서 항염증 작용을 한다고 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 흰민들레는 p38, ERK1/2, JNK의 인산화를 억제하고 NF- κ B의 활성화 억제를 통해 NO와 전염증성 cytokine의 생성을 억제하는 결과를 얻을 수 있었다. 최근의 많은 연구들에서 메탄올을 통해 유효성분을 추출하여 항염 등의 여러 연구에 많이 사용되고 있지만, 한의학에서 탕제(湯劑)는 주로 물로 전탕하여 사용되기 때문에 메탄올 추출물보다 더욱 의의가 있을 것 이라고 사료되며, 결론적으로, 흰민들레의 항염증효과는 염증성 질환에 있어서 치료와 예방에 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 흰민들레의 동물실험 등 추가적인 실험을 통하여 항염 효과에 대해 심도 있는 연구로 임상응용에 활용도가 많을 것으로 사료된다.

결론

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 흰민들레 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흰민들레 추출물은 대식세포에서 세포독성을 거의 나타내지 않았다.
2. 흰민들레 추출물은 대식세포에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였다.
3. 흰민들레 추출물은 대식세포에서 IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 cytokine의 생성을 단백질 수준과 mRNA수준에서 억제하였다.
4. 흰민들레 추출물은 대식세포에서 p38, JNK, ERK1/2의 인산화를 억제하였고, 또한 I κ -B의 분해를 억제하였다.

이상의 결과는 흰민들레의 물 추출물이 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO 및 IL-1 β , IL-6의 생성을 억제하였으며, MAPKs 중 p38, JNK, ERK1/2의 인산화와 I κ -B의 분해를 억제하였다. 따라서 흰민들레가 항염증 치료에 응용될 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmun Rev.* 2008 ; 7(4) : 305–8.
- Lopez-Bojorquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Teran G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch Med Res.* 2004 ; 35(6) : 465–79.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 ; 211(1) : 24–32
- Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbology.* 2009 ; 24(4) : 39–47.
- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991 ; 21(4) : 361–74.
- Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2004 ; 7(1) : 25–32.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004 ; 382(Pt 2) : 393–409.
- Lee WT. Coloured standard illustrations of Korean plants. Academy Books. 1996 : 380–1.
- Cho SY, Oh YJ, Park JY, Jang JY, Lee MK, Kim MJ. Effect of dandelion extracts (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2003 ; 32(3) : 458–63.
- Koo HN, Hong SH, Song BK, Kim CH, Yoo YH, Kim HM. *Taraxacum officinale* induces cyto-toxicity through TNF- α and IL-1 α secretion in Hep G2 cells. *Life Sci.* 2004 ; 74(9) : 1149–57.
- Park JY, Park CM, Kim JJ, Song YS. Hepatoprotective activity of dandelion (*Taraxacum officinale*) water extract against D-galactosamine-induced Hepatitis in rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 2008 ; 37(2) : 177–83.
- Sigstedt SC, Hooten CJ, Callewaert MC, Jenkins AR, Romem AE, Pullin MJ, Komienko A, Lowrey TK, Slambrouck SV, Steelant WF. Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2008 ; 32(5) : 1085–90.
- Jeon HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kang YS, Lim CJ, Kim YM, Park EH. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J Ethnopharmacol.* 2008 ; 115(1) : 82–8.
- Im DY, Lee KI. Nitric oxide production inhibitory and scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity of extracts from *Taraxacum officinale* and *Taraxacum coreanum*. *Kor J Medicinal Crop Sci.* 2011 ; 19(5) : 362–7.
- Lee AY. The protective effect of the fraction and active compounds from *Taraxacum coreanum* on inflammation, neuronal damage and gastric cancer. Busan University. 2014.
- Oh HK. Nutritional Composition and Antioxidative Activity of Different Parts of *Taraxacum coreanum* according to Drying Methods. *J Korean Diet Assoc.* 2014 ; 19(4) : 389–99.
- Im DY, Lee KI. Antioxidative and Antibacterial Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Extract and Fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korea Citation Index.* 2011 ; 19(4) : 238–45.
- Lee MH. Anti-inflammatory effect of the aerial part and root of *Taraxacum coreanum* on primary peritoneal macrophages stimulated with INF- γ and lipopolysaccharide. Kyoung-Hee University. 2011.
- Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon- γ . *J Infect Dis.* 1999 ; 179(4) : 939–44.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 ; 43(2) : 109–42.
- MaCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JI, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1993 ; 178(2) : 749–54.
- Oh CH. Translation. simple immunology. 3rd rev. ed. seoul : Medical korea. 2006 : 161–200.
- Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci.* 2000 ; 25(1) : 7–9.
- Celec P. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine the next generation. *Biomed Pharmacother.* 2004 ; 58(6–7) : 365–71.
- Gang A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002 ; 16(6) : 1053–68.